

Antonija Radić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

Sinteza nukleozida

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc Rosana Ribić

Zagreb, 2016.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	26. srpnja 2016.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	16. rujna 2016.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	23. rujna 2016.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Rosana Ribić

Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak	vii
§ 1. Uvod.....	1
§ 2. Povijesni pregled.....	2
§ 3. Struktura nukleozida.....	3
3.1. Pirimidinske baze.....	4
3.2. Purinske baze	5
3.3. Ugljikohidrati.....	7
§ 4. Nomenklatura i podjela.....	7
§ 5. Sinteza nukleozida	9
§ 6. Zaštita hidroksilnih skupina ugljikohidrata	10
6.1. Reakcije na anomernom centru ugljikohidrata.....	10
6.1.1. Reakcije s alkoholom u kiselom mediju.....	10
6.1.2. Koenigs Knorr metoda.....	12
6.2. Reakcije na ostalim hidroksilnim skupinama.....	14
6.2.1. Eterska zaštita hidroksilnih skupina	14
6.2.2. Esterska zaštita hidroksilnih skupina	15
6.2.3. Acetalna/ketalna zaštita hidroksilnih skupina	16
§ 7. Zaštita baza.....	17
§ 8. Metode kemijske sinteze nukleozida	17
8.1. Metoda teških metala (Koenigs Knorr)	18
8.2. Fischer-Helferich metoda (metoda fuzije)	21
8.3. Hilbert-Johnsonova i sililna metoda.....	22
8.3.1. Hilbert-Johnsonova metoda-kvaternizacijski postupak	22
8.3.2. Vorbruggen postupak- sililna metoda.....	23
§ 9. Primjena	27
9.1. SINTEZA OKSETANOCINA-nukleozida s modificiranim ugljikohidratom	28
§ 10. Zaključak.....	32
§ 11. Literaturna vrela	33

§ Sažetak

Nukleozidi su organski spojevi u kojima je purinska ili pirimidinska heterociklička baza povezana s ugljikohidratom ribozom ili deoksiribozom. Oni kao takvi izgrađuju biološki važne makromolekule-nukleinske kiseline. Veza između njih je *N*-glikozidna veza koja može postojati u *anti* ili *sin* konformaciji. Nukleozidi se mogu razlikovati prema vrsti ugljikohidrata i heterocikličke baze. Za potrebe sinteze nukleozida potrebno je adekvatno zaštititi ključne podstrukture (ugljikohidrate i baze). Najčešće zaštitne skupine baza su acilna i benzilna, a ugljikohidrata sililna, eterska, esterska i acetalna. Pažljivim odabirom i kombinacijama zaštitnih skupina ugljikohidrata i baza mogu se dobiti bolja iskorištenja. Tri metode koje se najčešće koriste prilikom sinteze nukleozida su Koenigs-Knorrova metoda, Fischer-Helferich te Hilbert-Johnsonova metoda. Svaka od ovih metoda sinteze *N*-glikozidne veze ima svoje prednosti i nedostatke. Dobrom kombinacijom reagenasa i uvjeta, moguće je kontrolirati stereoselektivnost i regioselektivnost reakcija. Naime, kako bi nastao termodinamički povoljniji produkt važno je odabrati najpogodniji glikozil-donor i glikozil-akceptor, otapalo i Lewisovu kiselinu te kontrolirati temperaturu. Nukleozidi nalaze svoju primjenu u agrokemiji, biotehnologiji, a najviše u medicini kao antitumorski i antiviralni lijekovi. Nukleozidni analog s modificiranom ugljikohidratnom komponentom, oksetanocin često je korišten antiviralni reagens te je u ovome radu prikazana njegova sinteza.

§ 1. Uvod

Nukleozidi su organski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže dušikovu heterocikličku bazu vezanu na ugljikohidrat ribozu ili deoksiribozu preko *N*-glikozidne veze i sastavni su dijelovi nukleinskih kiselina. Nukleozidne baze se dijele na purinske i pirimidinske. U purinske baze se ubrajaju adenin i gvanin, dok se u pirimidinske baze ubrajaju citozin i timin. U slučaju ribonukleinske kiseline (RNA), pirimidinska baza timin je zamijenjena uracilom.

Sinteza nukleozida uključuje spajanje nukleofilnog dušika iz heterocikličke baze s elektrofilnim anomernim ugljikovim atomom ugljikohidrata. Kod prirodnih nukleozida *N*-glikozidna veza kojom je povezana heterociklička baza i ugljikohidrat ima β konfiguraciju. Mogu se sintetizirati raznim metodama, tri najučestalije metode glikozilacije su Koenigs-Knorrova, direktna i trikloroacetimidatna metoda. Osim prirodnih nukleozida, sintetiziraju se i nukleozidni analozi kreirani s ciljem da oponašaju prirodne nukleozide i zamijene njihovo mjesto u nukleinskim kiselinama. Takvi spojevi pokazali su se kao dobre antitumorske i antiviralne supstance.

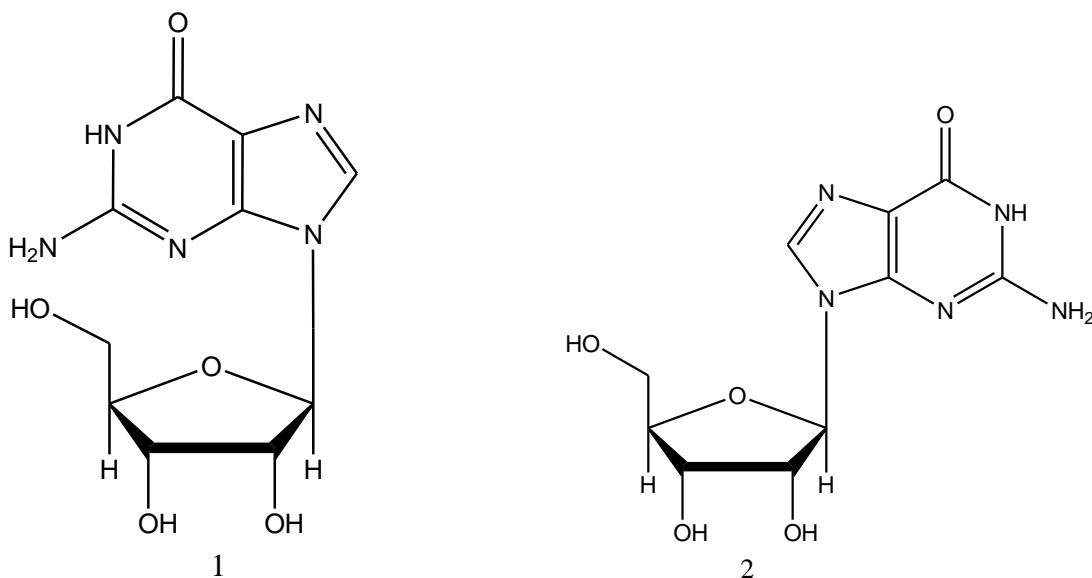
§ 2. Povijesni pregled

Otkriće nukleinskih kiselina seže u 1869. godinu kada je švicarski liječnik Friedrich Miescher iz bijelih krvnih zrnaca izolirao supstancu koju je nazvao *nuclein* (lat. *nucleus* - jezgra), a koja se od bjelančevina razlikovala po visokom udjelu fosfora. 1898. godine njegov učenik Richard Altmann otkrio je *nuclein* i u biljnim stanicama i na osnovu kemijskog sastava nazvao isti „nukleinska kiselina“. Smatrano je da se dana supstanca nalazi samo u kromosomima (danas se zna da postoji i izvan kromosoma, npr. u ribosomima). U razdoblju od 1905. -1940. godine Levane je radio na problemu nukleinskih kiselina i ustanovio da se DNA sastoji od nukleotida, ali struktura ostaje nejasna. U međuvremenu, 1928. , Frederick Griffith provodio je eksperimente u kojima je istovremeno ubrizgavao „mrtve“ (umrtvljene visokom temperaturom) infektivne i neinfektivne („žive“) bakterijske uzročnike upale pluća u miševe. Opazio je da su „mrtve“ infektivne bakterije upale pluća prenijele genetski materijal u neinfektivne nakon čega su se iste „transformirale“ u infektivne i uzrokovale bolest. Tu pojavu nazvao je „transformacija“ i pripisao ju „molekuli nasljeđa“. Desetak godina kasnije Oswald Avery nastavio je dani eksperiment kako bi ustanovio što je točno „molekula nasljeđa“. Uništio je lipide, ribonukleinske kiseline, ugljikohidrate i proteine bakterijskog uzročnika upale pluća, a pokus je ponovio s preostalim materijalom. Transformacija je bila i dalje prisutna. Tek nakon što je uništio deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) došlo je do izostanka procesa prijenosa genetskih informacija, te je na temelju toga zaključio da upravo deoksiribonukleinska kiselina predstavlja temelj nasljeđivanja. 1935. Klein i Thannhauser su pocijepali DNA i dobili kristalne nukleotide , a 1944. Avery otkrio je da je DNA odgovorna za transformaciju strukture. Nekoliko godina nakon njega, točnije 1951. Todd je odredio strukturu nukleozida(α -konfiguracija i β - glikozidna veza) kemijskom sintezom. Dvije godine nakon toga, James Watson i Francis Crick napravili su model DNA koji se i danas koristi te se može reći da je to bio početak „modeliranja“ nukleinskih kiselina. Zaključili su da se molekula DNA sastoji od dva lanca nukleotida, oba spiralno zavijena oko zajedničke osi. 1959.godine otkriven je idokuridin, prvi antivirusni nukleozid. Nakon njega otkriven je AZT (zidovudin), potencijalni lijek protiv raka. Prvi uspješni antivirusni nukleozid otkriven je 1970.-ih, nazvan

je aciklovir. Sljedećih godina, pa sve do danas istražuje se područje nukleozida u medicinskoj kemiji s ciljem razvoja novih i učinkovitih antitumorskih, antivirusnih i ostalih lijekova.

§ 3. Struktura nukleozida

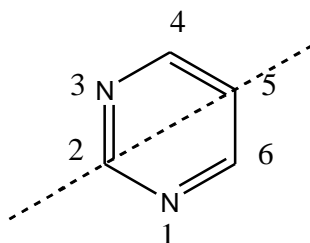
Strukturu nukleozida čine heterocikličke baze i ugljikohidrati. Baze od kojih su sastavljeni su pirimidinske i purinske. Pirimidinske su citozin, uracil i timin (C, U, T), a purinske su adenin i gvanin (A, G). Uracilna baza je prisutna kod molekule RNA (ribonukleinska kiselina), a timinska kod molekule DNA (deoksiribonukleinska kiselina). Heterocikličke baze su aromatskog karaktera. Prema vrsti ugljikohidrata, razlikujemo deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i ribonukleinske kiseline (RNA). Dok DNA sadrži deoksiribozu, kod RNA nalazimo ribozu. U pirimidinskim nukleozidima ugljikohidrat i baza su povezani C1'-N1 glikozidnom vezom, a kod purinskih nukleozida C1'-N9 glikozidnom vezom. Nukleozidi mogu postojati u *sin* i *anti* konformaciji (slika 1.)



Slika 1. Nukleozid gvanozin u *sin* (1) i *anti* (2) konformaciji

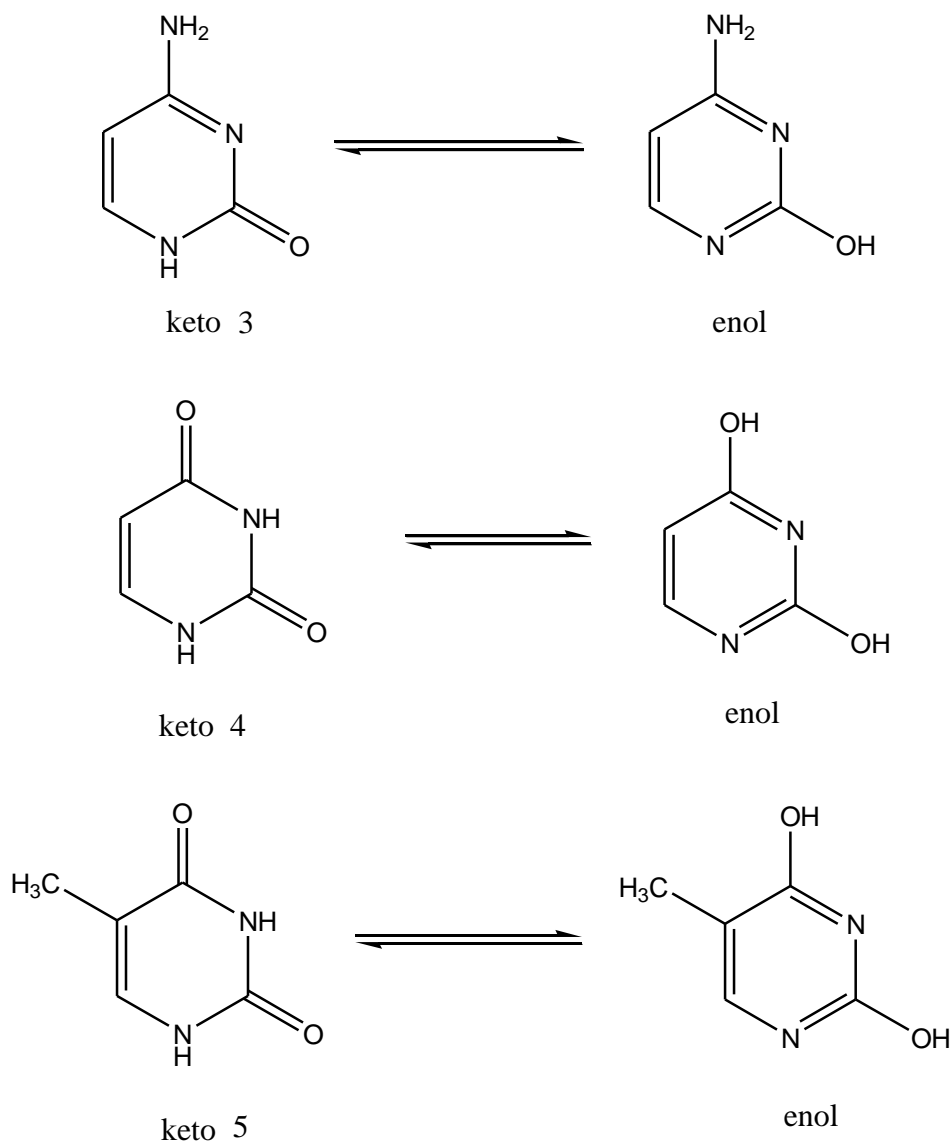
3.1. Pirimidinske baze

Pirimidin je heterociklički aromatski sustav koji se sastoji od četiri atoma ugljika i dva atoma dušika. Po prirodi je planarna molekula u kojoj je zadržana simetrija s obzirom na os koja prolazi kroz drugi i peti ugljikov atom (slika 2). Kemijska i fizikalna svojstva pirimidina su jako slična svojstvima purina. Pirimidin je slabog bazičnog karaktera, te za razliku od piridina podliježe reakcijama nukleofilne aromatske supstitucije. To svojstvo je posljedica dušikovih atoma koji utječu na smanjenje energije π sustava elektrona u prstenu što se manifestira otežanom elektrofilnom aromatskom supstitucijom. Time je ujedno smanjena rezonancijska stabilnost molekule što čini reakcije adicije vjerojatnijima za razliku od reakcija supstitucije.



Slika 2. Struktura pirimidinskog prstena

Navedene baze mogu postojati u keto i enolnoj formi (shema 1.). Prema IUPAC nomenklaturi ime citozina je 4-aminopirimidin-2-(1*H*)-on, uracila pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion i timina 2,4-diokso-5-metilpirimidin.

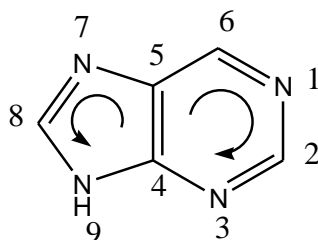


Shema 1. Prikaz keto i enolnih oblika pirimidinskih baza; citozin (3), uracil (4) i timin (5)

3.2. Purinske baze

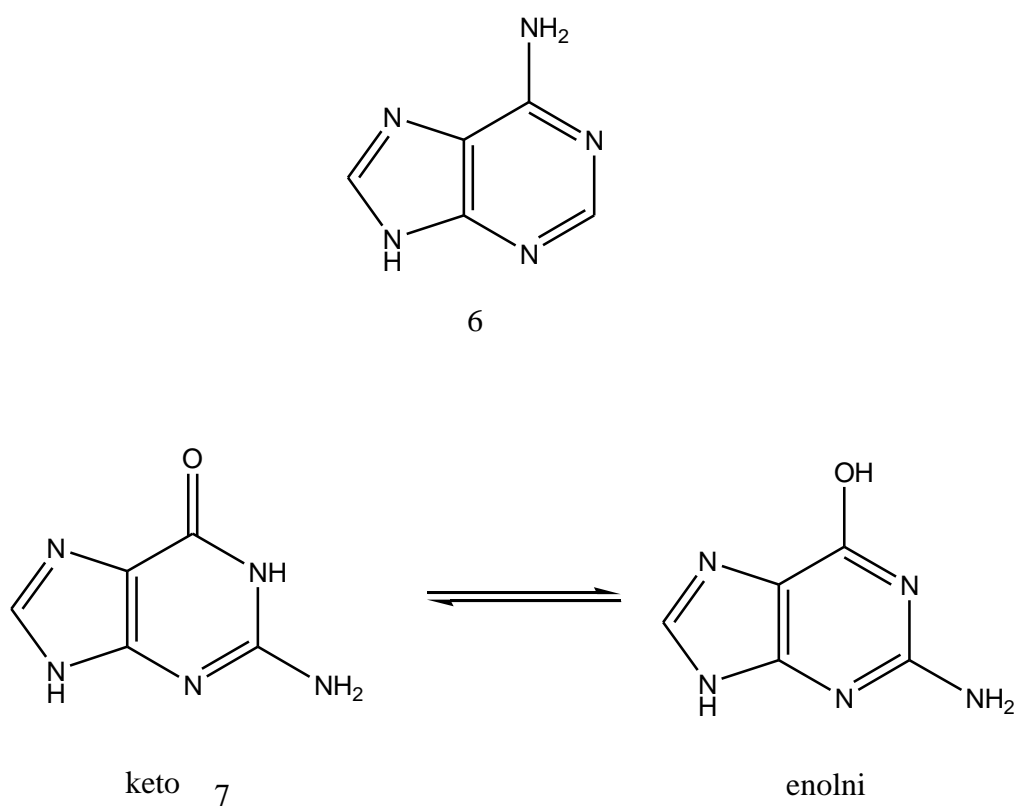
Purin je heterociklički aromatski sustav koji se sastoji od pet atoma ugljika i četiri atoma dušika. Strukturu purina čine međusobno spojeni pirimidinski i imidazolni prsten. Purini i supstituirani purini ujedno čine najrasprostranjeniju skupinu dušikovih heterocikla u prirodi. Aromatski karakter je posljedica konjugiranih dvostrukih veza koje značajno doprinose stabilnosti molekule. Po prirodi su najčešće krutine bijele boje amfoternog karaktera, koje u doticaju s kiselinom ili lužinom prelaze u odgovarajuću sol. Većina supstituiranih purina je

slabo topljiva u vodi i većini organskih otapala. Purin je moguće sintetizirati u laboratoriju na više načina, no za razliku od nekolicine njegovih derivata, još nije pronađen u prirodi. Purini je osnovna građevna jedinica nukleozidnih baza adenina i gvanina.



Slika 3. Struktura purinskog prstena

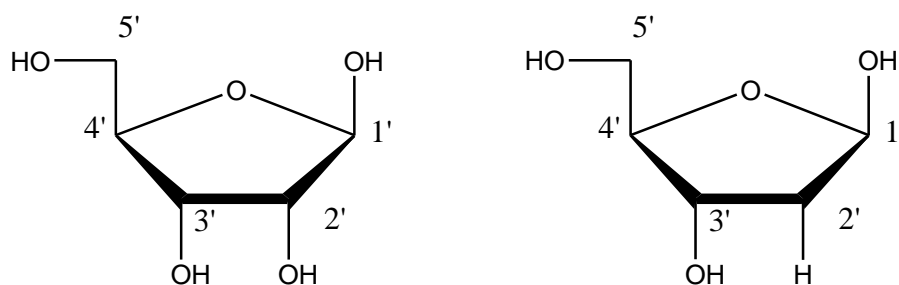
Samo gvanin može postojati u keto i enolnom obliku (shema 2.). Prema IUPAC nomenklaturi ime adenina je 9H -purin-6-amin, a gvanina 2-amino-9H-purin-6(1H)-on.



Shema 2. Prikaz adenina (6) i keto enolnog oblika gvanina (7)

3.3. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati koji ulaze u sastav nukleozida su dvije furanoze, odnosno dva peteročlana prstena koji sadrži 4 atoma ugljika i jedan atom kisika. Ribozu je β -D-ribofuranosa, a deoksiribozu je 2-deoksi- β -D-ribofuranosa (slika 4.). Za razliku od numeriranja prstena baze C-atomi šećera označavaju se od 1' do 5'.



Slika 4. Furanosni prstenovi (riboza i deoksiribozu) koji su sastavni dio nukleozida

§ 4. Nomenklatura i podjela

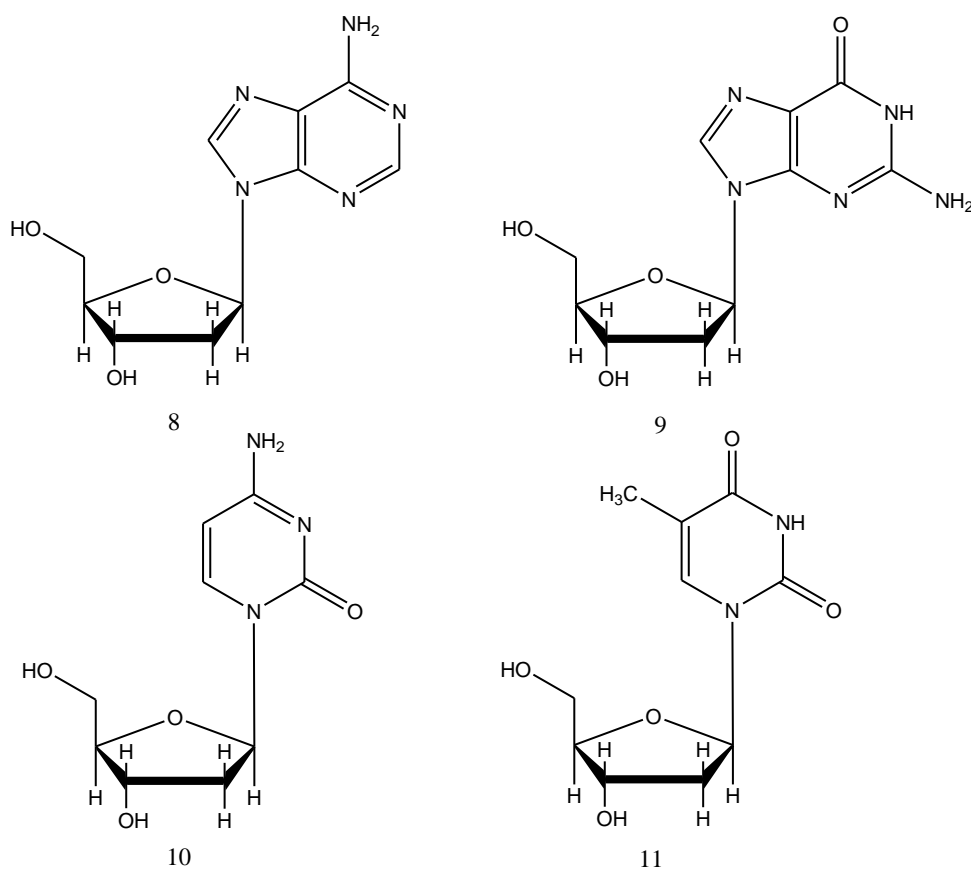
Nukleozidi, kao i ostali organski i anorganski spojevi, imenuju se prema pravilima Internacionalne unije za čistu i primjenjenu kemiju (IUPAC nomenklatura), ali imaju i svoje uobičajene, trivijalne nazive. Kemijski nazivi baza se izvode na osnovu prirode supstituenta i numeriranja atoma osnovnog heterocikličkog sustava. Kod pirimidinskih nukleozida na korijen imena baza dodaje se sufiks –IDIN, a kod purinskih nukleozida se dodaje –OZIN. U Tablici 1. navedena je podjela nukleozida, a u Tablici 2. trivijalna imena i IUPAC nazivi istih.

Tablica 1. Raspodjela nukleozida prema vrsti ugljikohidrata i heterocikličkih baza.

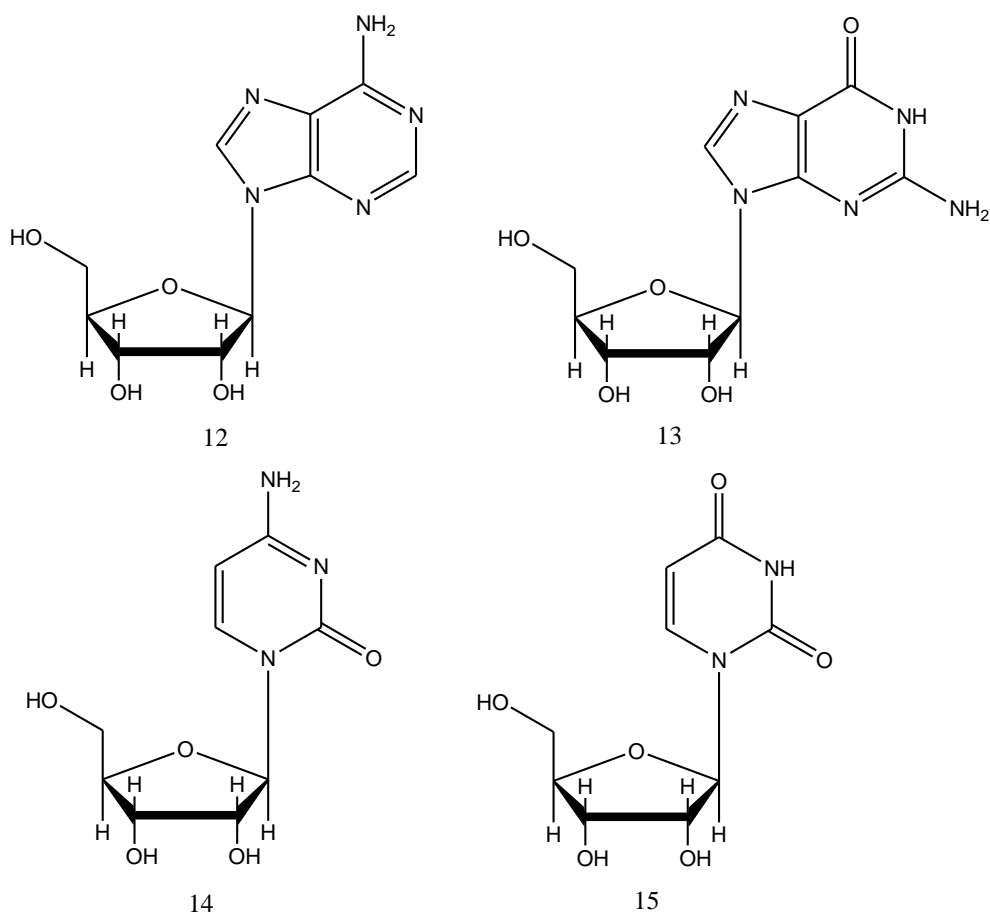
BAZA	Baza vezana na ribozu	Baza vezana na deoksiribozu
Adenin	Adenozin	deoksiadenozin
Gvanin	Gvanozin	deoksigvanozin
Uracil	Uridin	
Citozin	Citidin	deoksicitidin
Timin		timidin

Tablica 2. Trivijalna imena i IUPAC nazivi svih nukleozida

Nukleozid	IUPAC naziv
Adenozin	2-(6-aminopurin-9-il)-5-(hidroksimetil)oksolan-3,4-diol
Deoksiadenozin	5-(6-aminopurin-9-il)-2-(hidroksimetil)oksolan-3-ol
Gvanozin	2-amino-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il)-3H-purin-6-on
Deoksigvanozin	2-amino-9-(4-hidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il)-3H-purin-6-on
Uridin	1-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il)pirimidin-2,4-dion
Citidin	4-amino-1-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il)pirimidin-2-on
Deoksicitidin	4-amino-1-(4-hidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il)pirimidin-2-on
Timidin	1-(4-hidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il)-5-metilpirimidin-2,4-dion



Slika 5. Strukture nukleozida (ugljikohidrat deoksiriboza i heterociklička baza purin/pirimidin) prisutnih u DNA (deoksiadenozin(8), deoksigvanozin(9), deoksicitozin(10), timidin(11))



Slika 6. Strukture nukleozida(ugljikohidrat riboza i heterociklička baza purin/pirimidin) prisutnih u RNA(adenozin(12), gvanozin(13), citozin(14), uridin(15))

§ 5. Sinteza nukleozida

Nukleozidi se sintetiziraju tako da nukleofilna heterociklička baza napadne molekulu ugljikohidrata elektrofilnu na anomernom C-atomu. Kod sinteze potrebno je zaštititi hidroksilne skupine šećera i zaštititi skupine baze koje ne sudjeluju u stvaranju N-glikozidne veze. Najčešće zaštitne skupine za heterocikličke baze su benzilna i acilna skupina. Monosaharidi, riboza, sadrže nekoliko hidroksilnih skupina različite reaktivnosti, a često su prisutne i druge funkcionalne skupine kao što je karbonilna ili amino skupina. Problem kod sinteze ugljikohidratnih derivata je regioselektivnost. Kako bi se sintetizirao željeni produkt,

potrebno je odabrati odgovarajuće zaštitne skupine. Dobre zaštitne skupine su one koje se mogu ukloniti bez da se poremeti ostatak molekule. Danas je na raspolaganju veliki broj zaštitnih skupina pa ih treba odabrati tako da daju što veću fleksibilnost pri sintezi. Najčešće zaštitne skupine koje se susreću u kemiji ugljikohidrata su acilne (esterske), eterske i acetalne/ketalne zaštite. Hidroksilne skupine ugljikohidrata nisu jednake reaktivnosti i na temelju toga uvedeni su brojni postupci regioselektivnog uvođenja zaštitnih skupina i njihovog uklanjanja.

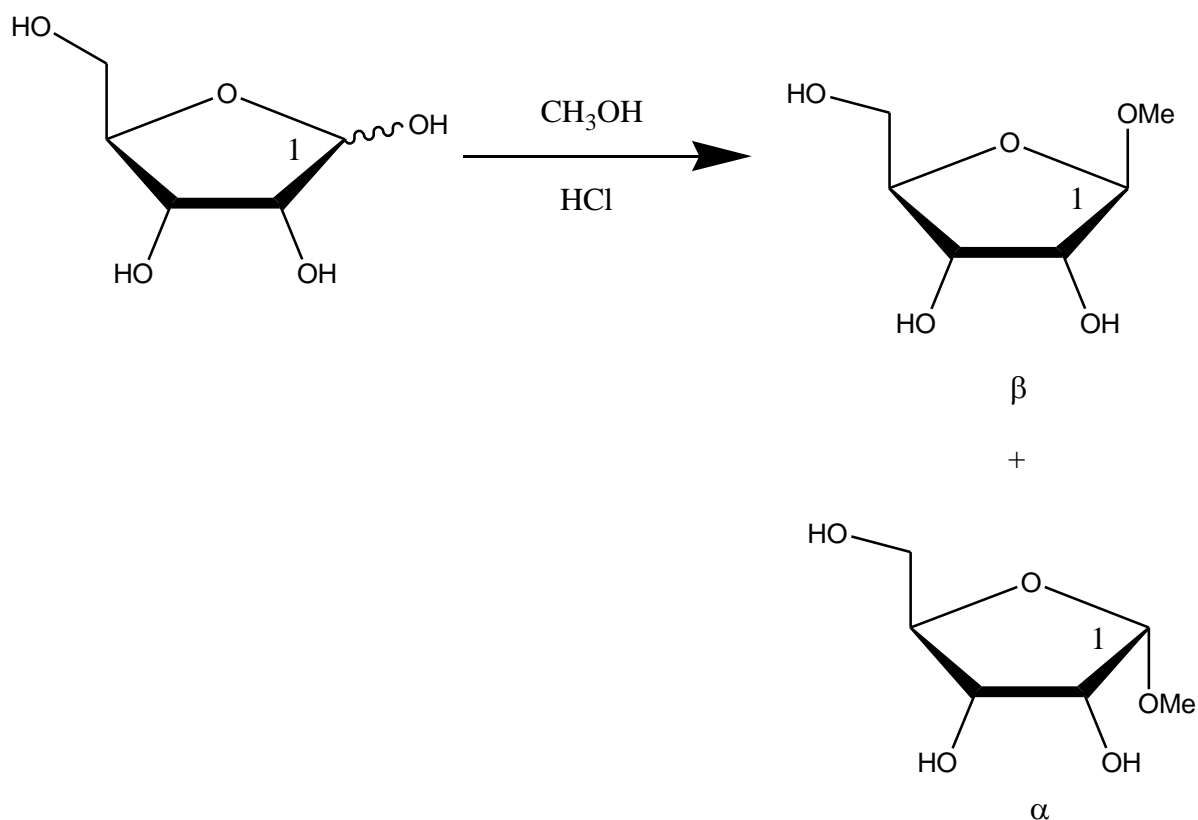
§ 6. Zaštita hidroksilnih skupina ugljikohidrata

6.1. Reakcije na anomernom centru ugljikohidrata

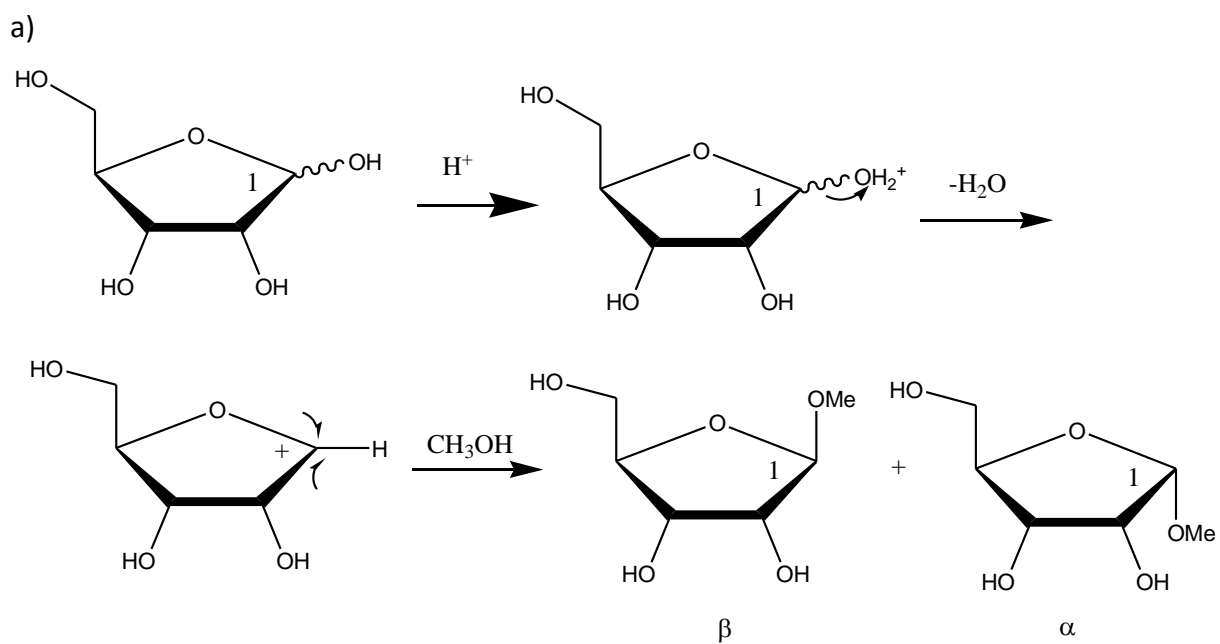
Anomerni ugljikov atom je najreaktivniji u ugljikohidratnoj jedinici. Ukoliko želimo dobiti *N*-nukleozid tada nije potrebna zaštita, već aktivacija. Ukoliko želimo analog ili derivat nukleozida kod kojeg nije *N*-glikozidna veza na anomernom centru tada je potrebno zaštititi OH skupinu na tom položaju.

6.1.1. Reakcije s alkoholom u kiselom mediju

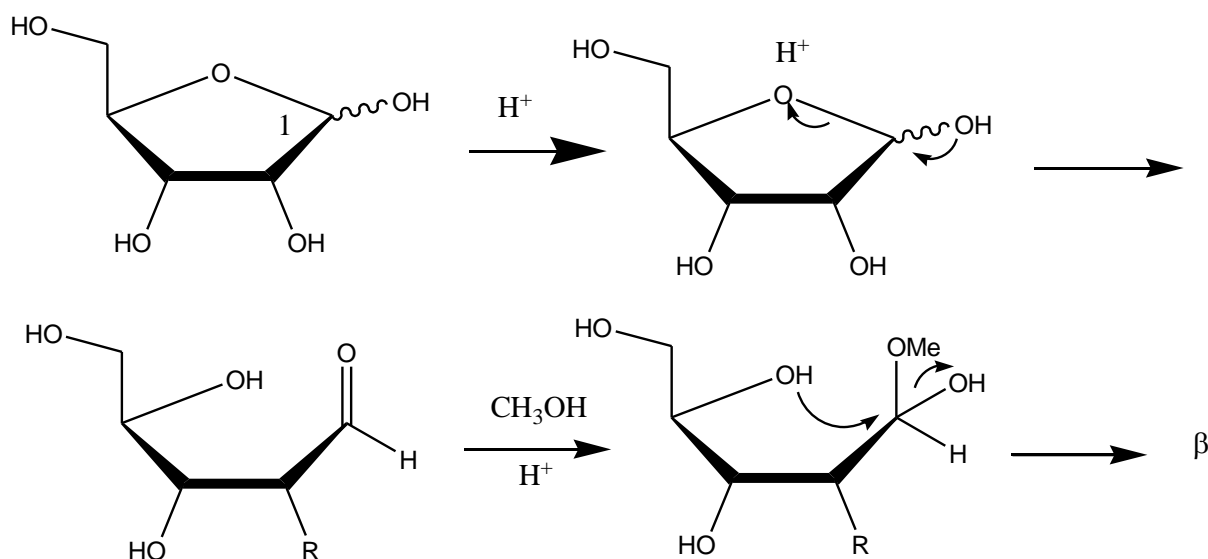
Anomerna OH skupina je centar reaktivnosti, zato se ona prilikom sinteze treba zaštititi. Reakcijama na anomernom centru šećera nastaju glikozidi, reakcijama glikozidacije. Postupak sinteze *O*-glikozida uključuje prevođenje ugljikohidrata u pogodan glikozilini donor aktivacijom anomernog ugljikova atoma te stereoselektivni, kataliziran prijenos glikozilnog donora (ugljikohidrata) na akceptor (heterocikličku bazu). Općenito se dobiva smjesa α i β anomera (shema 3.).



Shema 3. Reakcija ugljikohidrata s alkoholom uz prisutnost kiseline (nastaje smjesa izomera α i β)



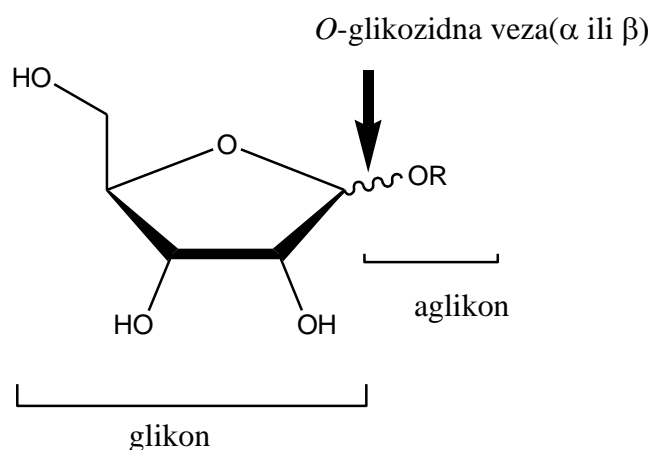
b)



Shema 3. Mehanizam reakcije ugljikohidrata s alkoholom uz kiselinu kao katalizator

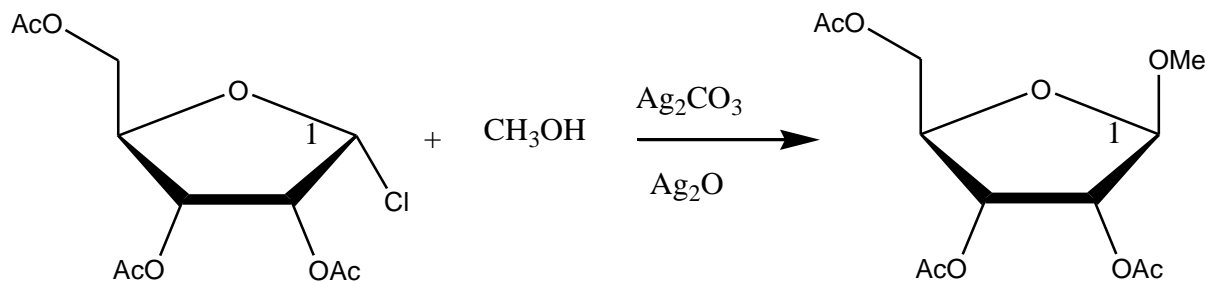
6.1.2. Koenigs Knorr metoda

Koenigs Knorova reakcija je najstarija i jako često korištena metoda pripreve *O*-glikozida. Glikozid se sastoji od glikonske (ugljikohidratne) i aglikonske komponente.

Slika 7. Struktura *O*-glikozida

Reakcija se odvija uz dodatak soli srebra (promotori reakcije) kao što su srebrov karbonat (Ag_2CO_3) i srebrov oksid (Ag_2O) koje su netopljive ili srebrov triflat ($AgOTf$) i srebrov klorat

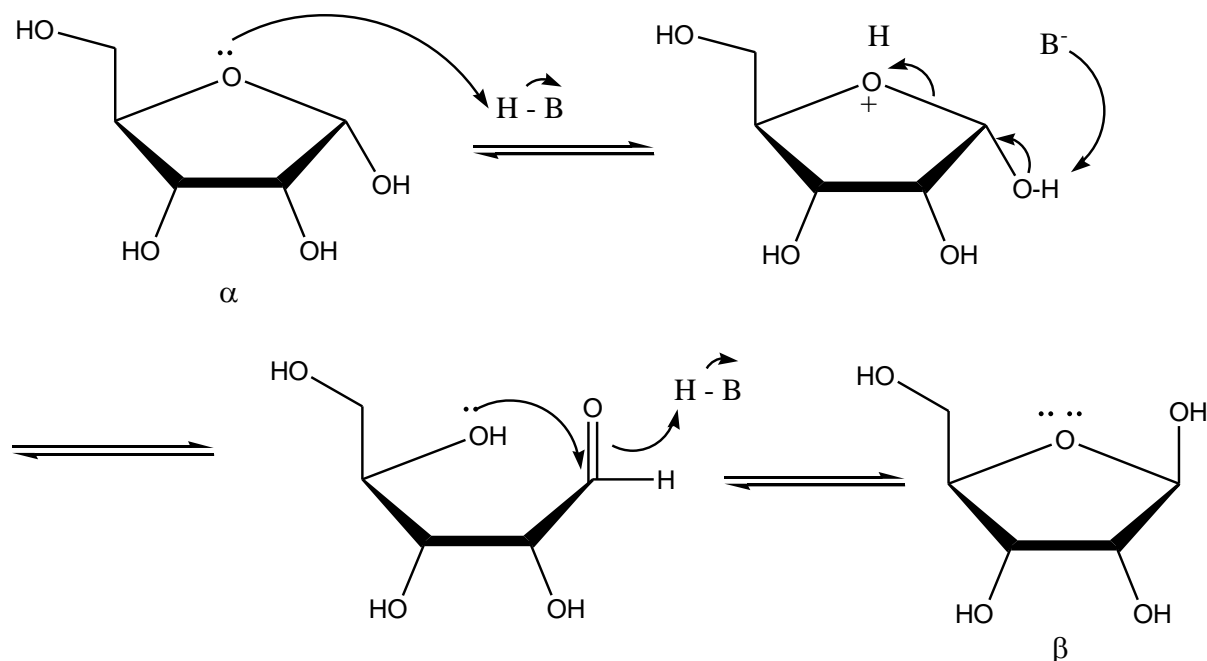
(AgClO_3) koje su topljive u diklormetanu. Važno je da je ova reakcija stereospecifična. Nastaje onaj glikozid u kojem je aglikonski dio u trans položaju u odnosu na C-2 skupinu (1,2-*trans* glikozid).



$\text{Ac} = -\text{CO}-\text{CH}_3$

Shema 4. Koenigs-Knorr-ova reakcija

U ovoj reakciji dolazi do mutarotacije (shema 5.), taj termin odnosi se na epimerizaciju anomernog ugljikovog atoma. U vodenoj otopini postiže se ravnotežna smjesa dvaju anomera koji prelaze jedan u drugi preko otvorenog aldehidnog oblika. Glikozil-donori su glikozil-halogenidi, u ovom slučaju naveden je glikozil-klorid.



Shema 5. Mehanizam reakcije koji pokazuje kako dolazi do inverzije konfiguracije

6.2. Reakcije na ostalim hidroksilnim skupinama

6.2.1. Eterska zaštita hidroksilnih skupina

Eterska zaštita uvodi se u više oblika koji su navedeni u Tablici 3. Odabir eterske vrste ovisi o reakcijskim uvjetima, a reakcija uvođenja provodi se poznatom Williamsonovom sintezom, koja se zbiva u prisutnosti baze, natrijevog hidrida ili hidroksida, i alkil- ili aril- halogenida. Najčešće korištene zaštite su benzilne zaštitne skupine zato jer se uklanjanju vrlo jednostavno i nestabilne su u kiselim i bazičnim uvjetima i mogu se razložiti hidrolizom. Alkil-eteri se koriste puno manje jer su stabilni pod djelovanjem jakih baza i kiselina.

Kod metilne zaštite metiliraju se sve hidroksilne skupine. Ova metoda se rijetko koristi, najviše u plinskoj kromatografiji. Reagensi koji se koriste u metilnoj zaštiti navedeni su u tablici 3. Uklanjanju se jako teško jer su stabilne u kiselim i baznim uvjetima reakcije. 2-(trimetilsilil)etoksimetilne (SEM), metoksimetilne (MEM), benzilne (Bn) i tetrahidropiranične (Thp) zaštite koriste se kod primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina. Trifenilmetilna (Tr) zaštita je selektivna zaštita primarnih hidroksilnih skupina. Kod sililnih zaštita kako raste razgranatost tako zaštite postaju selektivnije, pa se tako kod trimetilsililne (Me_3Si) zaštite sililiraju sve hidroksilne skupine. *Tert*-butildimetilsilil (TBDMS) zaštićuje više primarnu hidroksilnu skupinu, ali nije selektivan, *tert*-butildifenilsilil (TBDPS) je selektivan, a tetraizopropildisiloksi (TIPDS) selektivno i istovremeno zaštićuje 3' i 5' hidroksilnu skupinu nukleozida.

Tablica 3. Reagensi za zaštite hidroksilnih skupina ugljikohidrata koji kao produkte daju etere i reagensi za uklanjanje eterskih skupina

ZAŠTITNE SKUPINE	REAGENCI ZA ZAŠTITE-ETERI	REAGENCI ZA UKLANJANJE
Metilna	$\text{CH}_3\text{I}/\text{Ag}_2\text{O}/\text{DMF}$	Me_3SiI
	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{NaOH}/n\text{Bu}_4\text{NI}$	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$
	$\text{CH}_2\text{N}_2/\text{EtOH}$	
2-(trimetilsilil)etoksimetilna	$\text{SEM-Cl}/\text{Py}$	$\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}$
Metoksimetilna	$\text{MEM-Cl}/\text{NaH}/\text{THF}$	HCl/MeOH
		$\text{ZnBr}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$
Benzilna	$\text{Bn-Cl}/\text{NaH}/\text{THF}$	$\text{H}_2/\text{Pd}/\text{C}$
		Me_3SiI
		BF_3
		80 % HAc
Tritilna	TrCl/Py	HCl/MeOH
		kisele ionske smole
		silikagel
		u kiselom
Tetrahidropiranična	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$	
Sililne	$(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NH}/\text{Me}_3\text{SiCl}$	alkoholi i vlaga
	$(\text{Me}_3)_3\text{C-Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}/\text{imidazol}/\text{DMF}$	$\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}$
	$\text{TBDMS-Cl}/\text{DMAP}/\text{Et}_3\text{N}$	$\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}$
	$\text{TBDPS-Cl}/\text{imidazol}/\text{DMF}$	$\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}$
	$\text{TIPDSCl}_2/\text{imidazol}/\text{DMF}$	$\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}$

6.2.2. Esterska zaštita hidroksilnih skupina

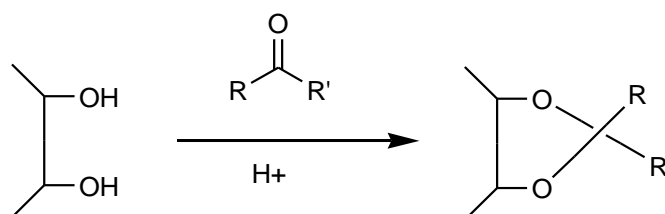
Kod acetatne i benzoilne zaštite aciliraju se sve hidroksilne skupine dok se aril i alkil-sulfonati više upotrebljavaju kao dobre odlazeće skupine, ali mogu biti i zaštitne grupe. Ako se upotrebljavaju kao odlazeće grupe može doći do inverzije konfiguracije. Prilikom acetatne zaštite, ako postoji susjedna hidroksilna grupa dolazi do migracije i esteri koji tada nastanu su stabilni u blago kiselim uvjetima.

Tablica 4. Reagensi za zaštite hidroksilnih skupina koji kao produkte daju estere, te reagensi za uklanjanje esterskih skupina

ZAŠTITNE SKUPINE	REAGENCI ZA ZAŠTITE-ESTERI	REAGENCI ZA UKLANJANJE
Acetatna	Ac_2O	NH_3/MeOH
Benzoilna	BzCl ili BzBr/Py	NaOMe/MeOH
	$\text{Bz}_2\text{O}/\text{Py}$	NH_3/MeOH
Aril i aklil-sulfonatna	TsCl/Py	Raney nikal
	MsCl/Py	

6.2.3. Acetalna/ketalna zaštita hidroksilnih skupina

Kod takvih metoda koriste se ciklički acetali koji zaštićuju vicinalne hidroksilne skupine. One predstavljaju dvije funkcionalne grupe vezane na dva susjedna atoma ugljika. Kao reagensi za zaštite upotrebljavaju se aceton, benzaldehid i acetaldehid. Benziliden acetali su značajno stabilniji od izopropiliden derivata. Zbog energetskih razloga aceton reagira isključivo s vicinalnim skupinama koje su u *cis*-položaju u molekuli ugljikohidrata i nastaje peteročlani prsten 2',3'-dioksolan. Acetalne odnosno ketalne skupine uklanjanju se u acetonu uz prisutstvo kiselina (ili Lewisove kiseline npr. ZnCl_2).



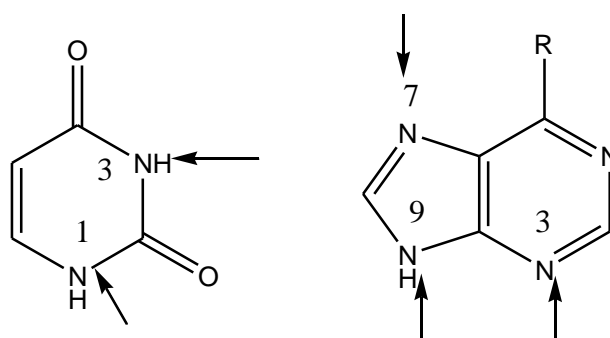
Shema 6. Zaštita vicinalnih skupina

§ 7. Zaštita baza

Kod sinteze nukleozida potrebno je zaštititi heterocikličke baze. Obavezno se zaštićuju amino skupine adenina, gvanina kod purinskih baza i citozina kod pirimidinskih. Adenin se najčešće zaštićuje benzil-kloridom (BzCl), gvanin butil-kloridom (BuCl), a citozin anhidridom benzojeve kiseline (Bz₂O). Acilne skupine se uzimaju kao zaštitne, najčešće su to benzilne i acilne koje se na kraju lako odstranjuju amonijakom u lužnatim uvjetima. Još jedna često korištena zaštitna skupina je *tert*-butoksikarbonil (Boc). Reagens za uvođenje je Boc-Cl ili (Boc)₂O. Zaštitna skupina Boc se uklanja pomoću triflourooctene kiseline (CF₃COOH) u BF₃/Et₂O/HF.

§ 8. Metode kemijske sinteze nukleozida

Postoji više metoda kemijske sinteze nukleozida, najprije će se obraditi kondenzacija ugljikohidrata i nukleobaza. U tu vrstu sinteze, pripadaju Koenigs-Knorrova metoda (metoda teških metala), Helferich metoda (metoda fuzije) i Hilbert-Johnsonova metoda i sililna metoda. Nadalje, poznaje se i sinteza građenjem heterocikličke baze. Za sintezu bitno je zaštititi i aktivirati ugljikohidrate na prethodno opisane načine, zatim poznavati mjesto u nukleobazama na kojima može doći do supstitucije te aktivirati heterociklički sustav.

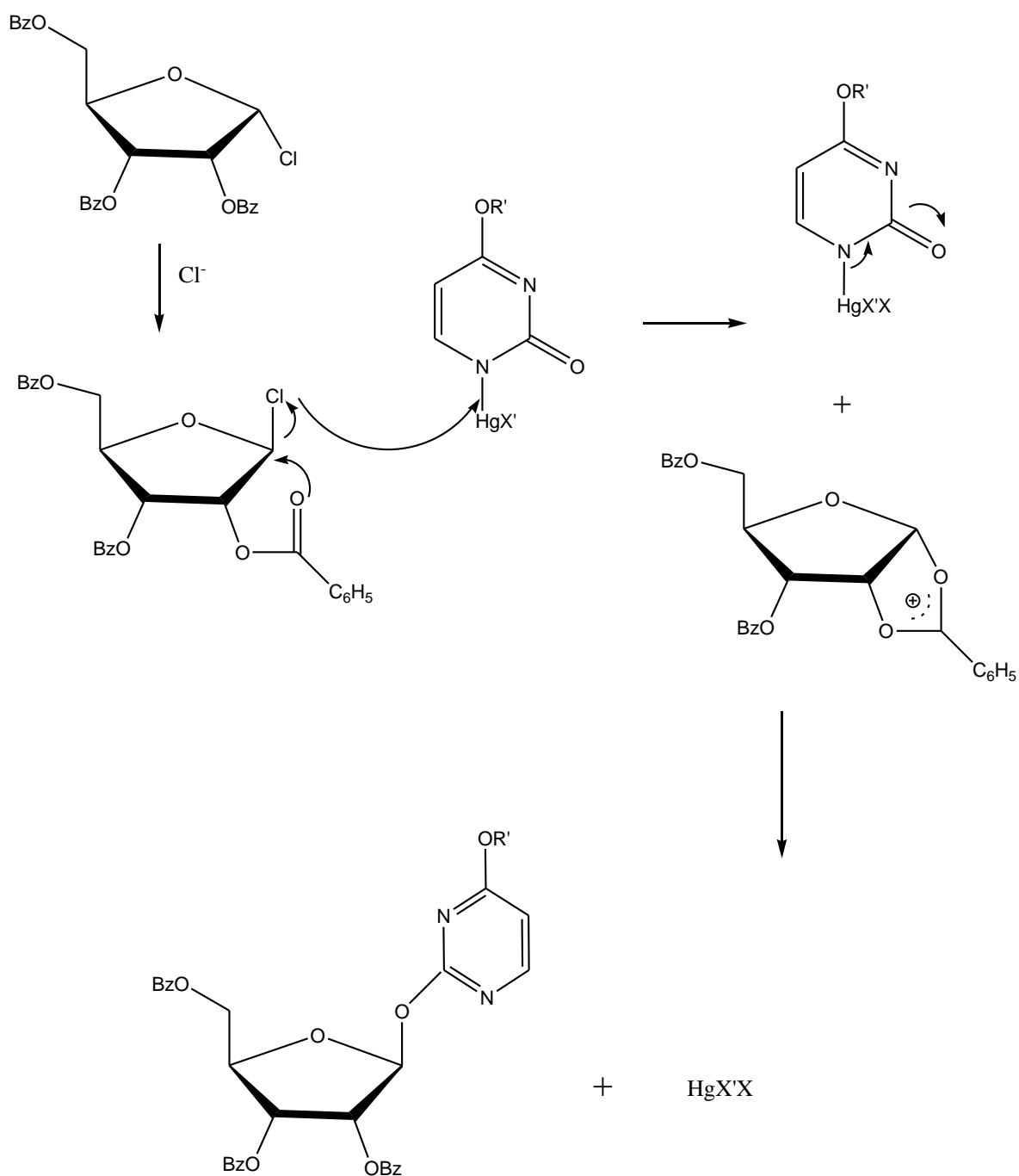


Slika 8. Moguća mjesta supstitucije na nukleobazama

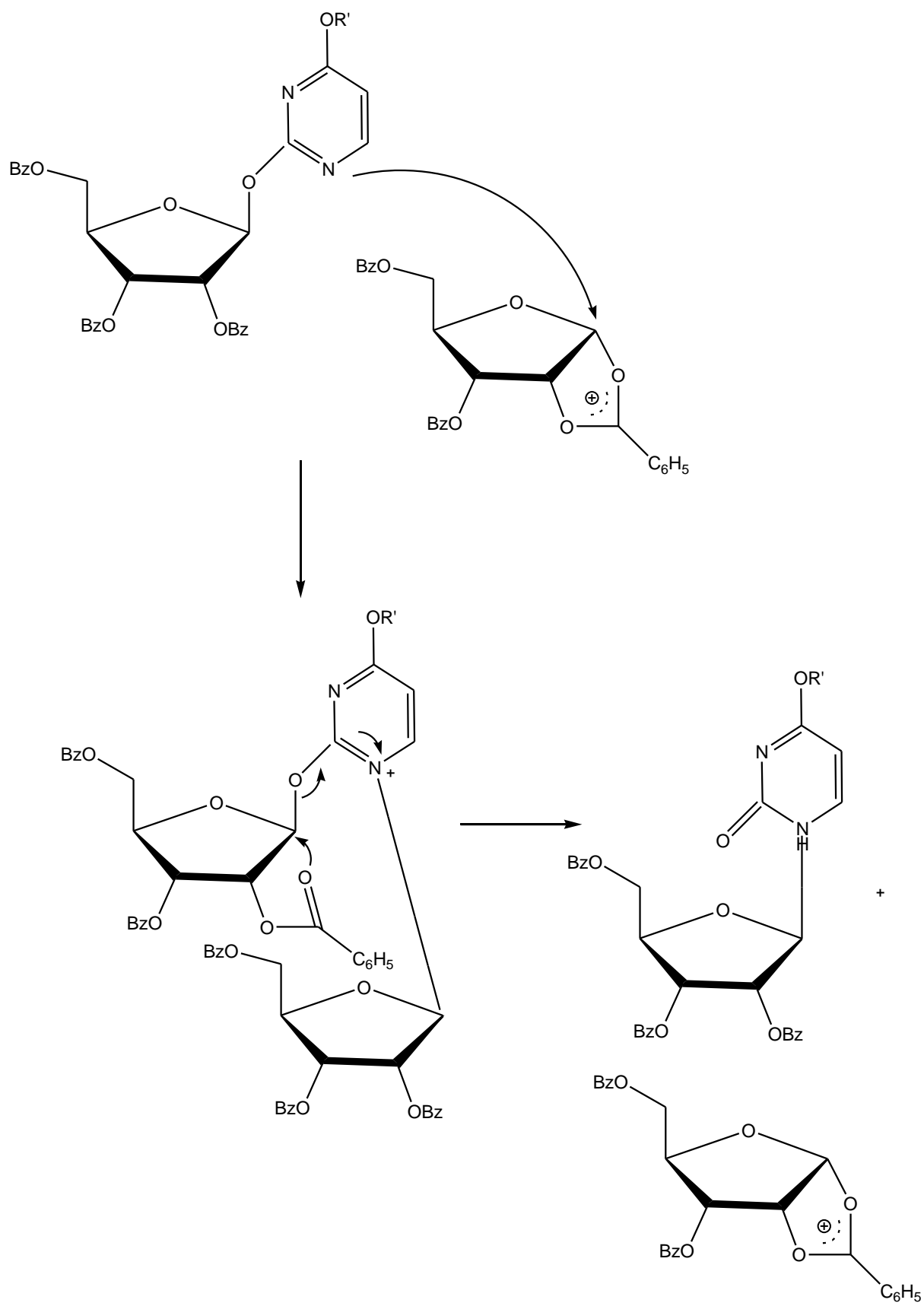
8.1. Metoda teških metala (Koenigs-Knorr)

Ova metoda je ukratko objašnjena kod zaštite hidroksilnih skupina ugljikohidrata. U njoj se koriste soli žive i srebra, no, sinteza sa solima žive je bolja iz nekoliko razloga: veze žive s heterocikličkim bazama su više kovalentnog karaktera, živa se ponaša kao odlazeća skupina u elektrofilnoj supstituciji pirimidina, njene soli su topljivije i kraće je vrijeme trajanja reakcije. Soli srebra ponašaju se kao ambidenti nukleofil koji napada aciloksonijev ion šećera dajući glikozid.

Nadalje, za ovu reakciju potreban je β -1-halogen-*O*-benzoil derivata šećera, odnosno 1,2 ciklički aciloksonijev ion. Živina sol pirimidina reagira s jednom ekvivalentnom količinom halogen-šećera jer su slabi glikozil donori i lako se hidroliziraju, a na kraju daju smjesu *O*-glikozida i nukleozida, dok živina sol purina daje najprije N-3 nukleozid koji onda transglikozidacijom prelazi u N-9 nukleozid. Reakcijom živine soli pirimidina i polovicom ekvivalenta halogen-šećera dolazi do brze pretvorbe *O*-glikozida u nukleozid. Međutim, ako je prisutan višak HgCl_2 također ide pretvorba *O*-glikozida u nukleozid, ali reakcija je spora i manja su iskorištenja. Katalizatori koji se koriste u ovoj metodi su HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{CN})_2$ i HgBr_2 . U RIBO-seriji nastaju uglavnom β -nukleozidi, a α - nastaju samo u tragovima, dok u 2'-deoksi seriji nastaje smjesa α i β nukleozida. Nedostatak ove metode je što su derivati živinih soli slabo topljivi, a derivati halogen-šećera nestabilni. Sintezom pirimidinskih nukleozida metodom živinih soli najprije nastane *O*-glikozid koji se onda pretvara u nukleozid što prikazuju sheme 7. i 8.



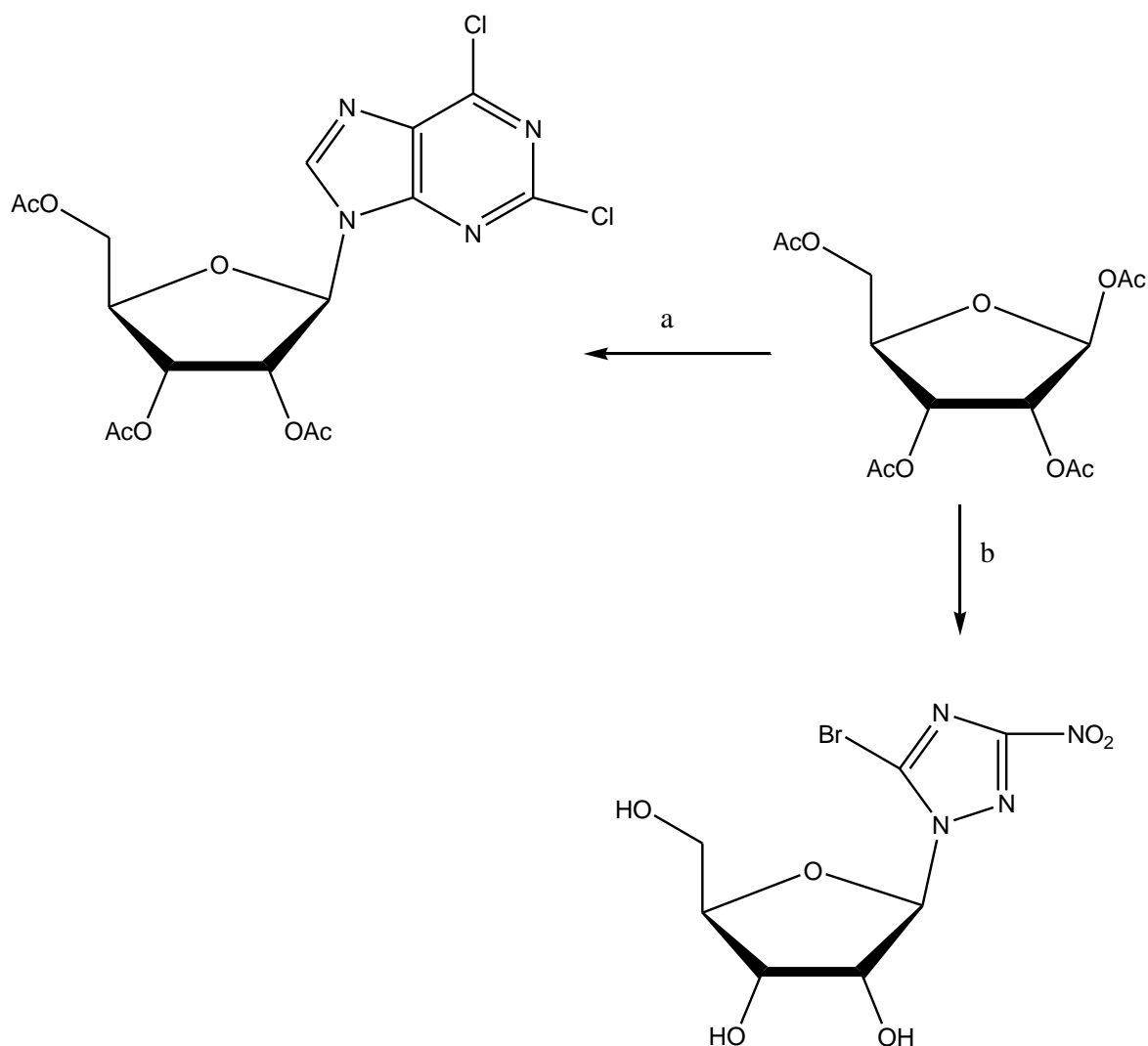
Shema 7. Nastajanje O-glikozida kondenzacijom derivata uracila i riboze



Shema 8. Pretvorba O-glikozida u nukleozid

8.2. Fischer-Helferich metoda (metoda fuzije)

To je metoda koja reakcijom purinske baze i peraciliranog ugljikohidrata uz zagrijavanje i određene katalizatore (najčešće Lewisove kiseline) daje nukleozide. Amino i hidroksi purini ne reagiraju ovim reakcijom jer imaju visoke temperature tališta, također i slabo kiseli purini, poput 6-merkaptopurina su neraktivni. Acilirani derivati purina i kiseli purini (6-cijano, 2,6-dikloro, 2,6,8-trikloro) reagiraju na ovaj način, odnosno ova metoda je najbolja za purine koji imaju elektron akceptorsku grupu i niska tališta. Katalizatori u ovoj reakciji su TiCl_4 , $\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3\text{H}$, ZnCl_2 , CHCl_2COOH te I_2 . Prednost ove metode je što se ne moraju zaštititi heterocikličke baze i reagiraju 1-O-acil derivati ugljikohidrata koji se stabilniji od halogenoza i ne nastaju N-3 derivati purina. Pirimidini ovom metodom daju slaba iskorištenja (maksimalno do 70 %) i smjesa nije homogena talina. Ovom metodom prvi puta su sintetizirani adenzin i gvanozin.



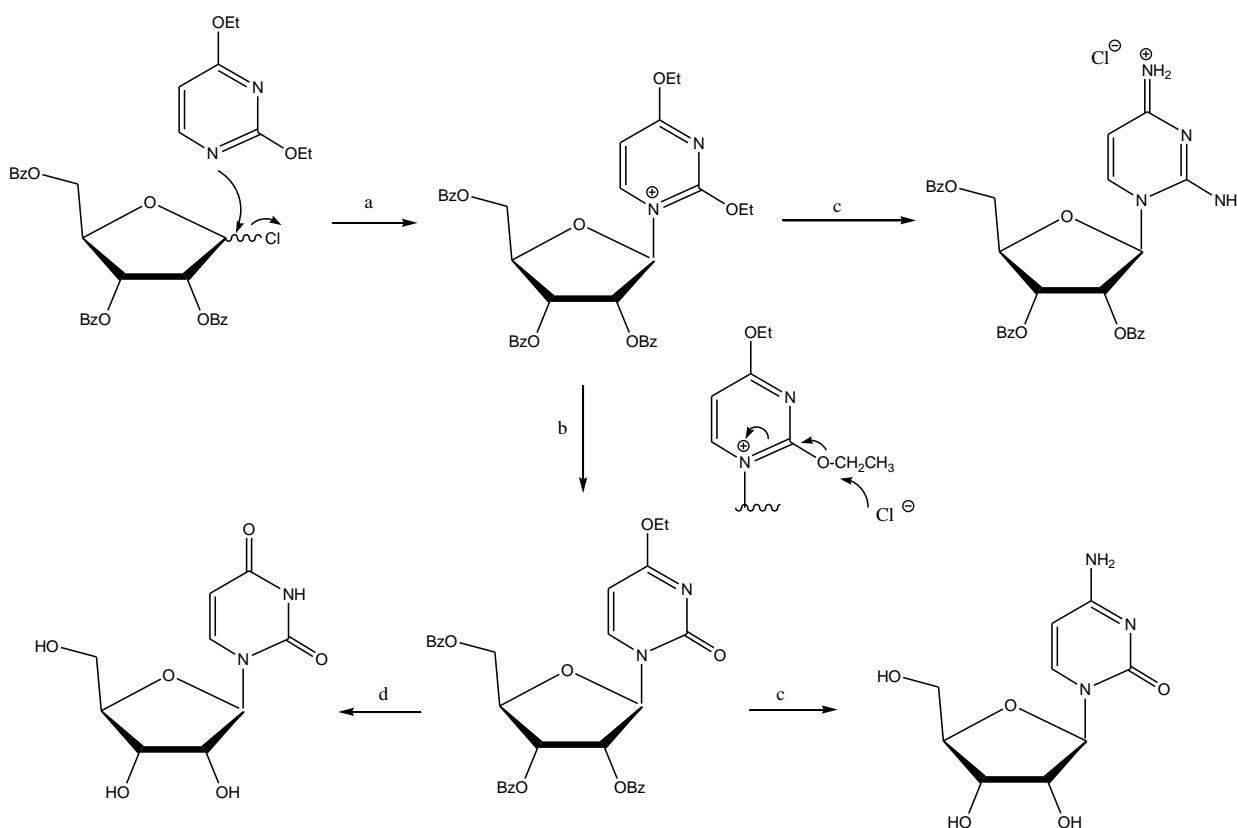
Shema 9. Metoda fuzije kod sinteze nukleozida. Reagensi a) 2,6-dikloropurin, octena kiselina, taljenje na 150°, b) 3-bromo-5-nitro-1,2,4-triazol, octena kiselina, taljenje na 150°.

8.3. Hilbert-Johnsonova i sililna metoda

8.3.1. Hilbert-Johnsonova metoda - kvaternizacijski postupak

Kod ove metode koriste se supstituirani dialkoksipirimidini koji su dovoljno nukleofilni da izravno reagiraju sa 1-halogen ugljikohidratom bez potrebe za elektrofilnom katalizom. Dialkoksipirimidini nisu komercijalni i sinteza ide u više koraka. Ova metoda uključuje alkiliranje 2-alkoksipirimidina koji onda reagira s halogen ugljikohidratom i kao početni produkt daje kvaternu sol koja pri višim temperaturama eliminira alkil halogenid kako bi se dobio međuprodukt kondenzacije. Metoda nije stereoselektivna pa nastaje smjesa α i

β nukleozida, uz prisutnost HgBr_2 povećava se udio α -anomera. U ovoj metodi ako je prisutna ribo-serija ugljikohidrata daje više β -anomera, dok deoksiribo-serija više α -anomera. Heterocikličke baze se zaštićuju dealkiliranjem u kiselom, ali je to teško postići i slabija su iskorištenja.



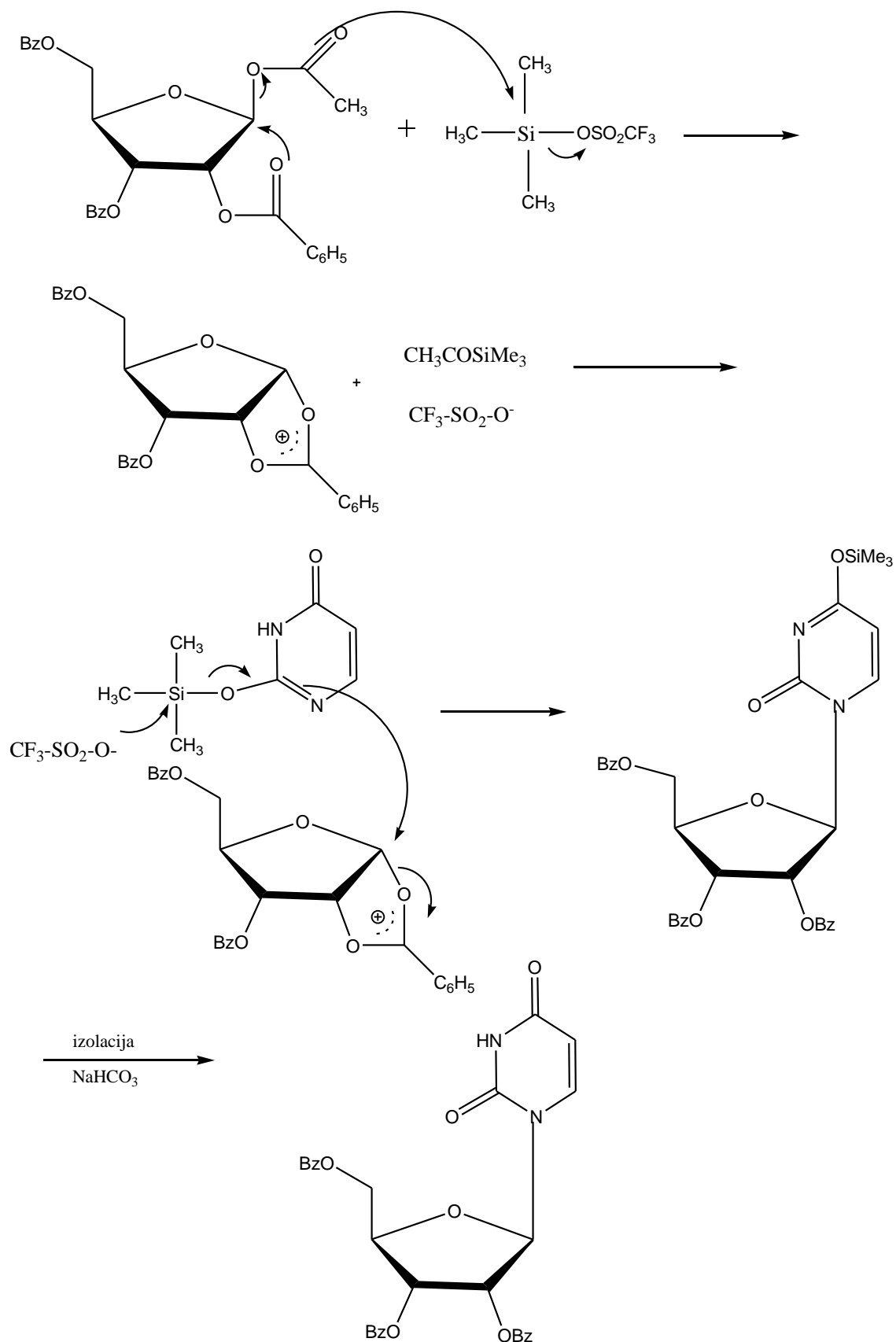
Shema 10. Kvaternizacijski postupak Hilbert-Johnsonove metode u nukleozidnoj sintezi.

Reagensi a) CH_3CN , 10° , b) CH_3CN , refluks, c) NH_3 , MeOH, d) NaOH.

8.3.2. Vorbruggen postupak - sililna metoda

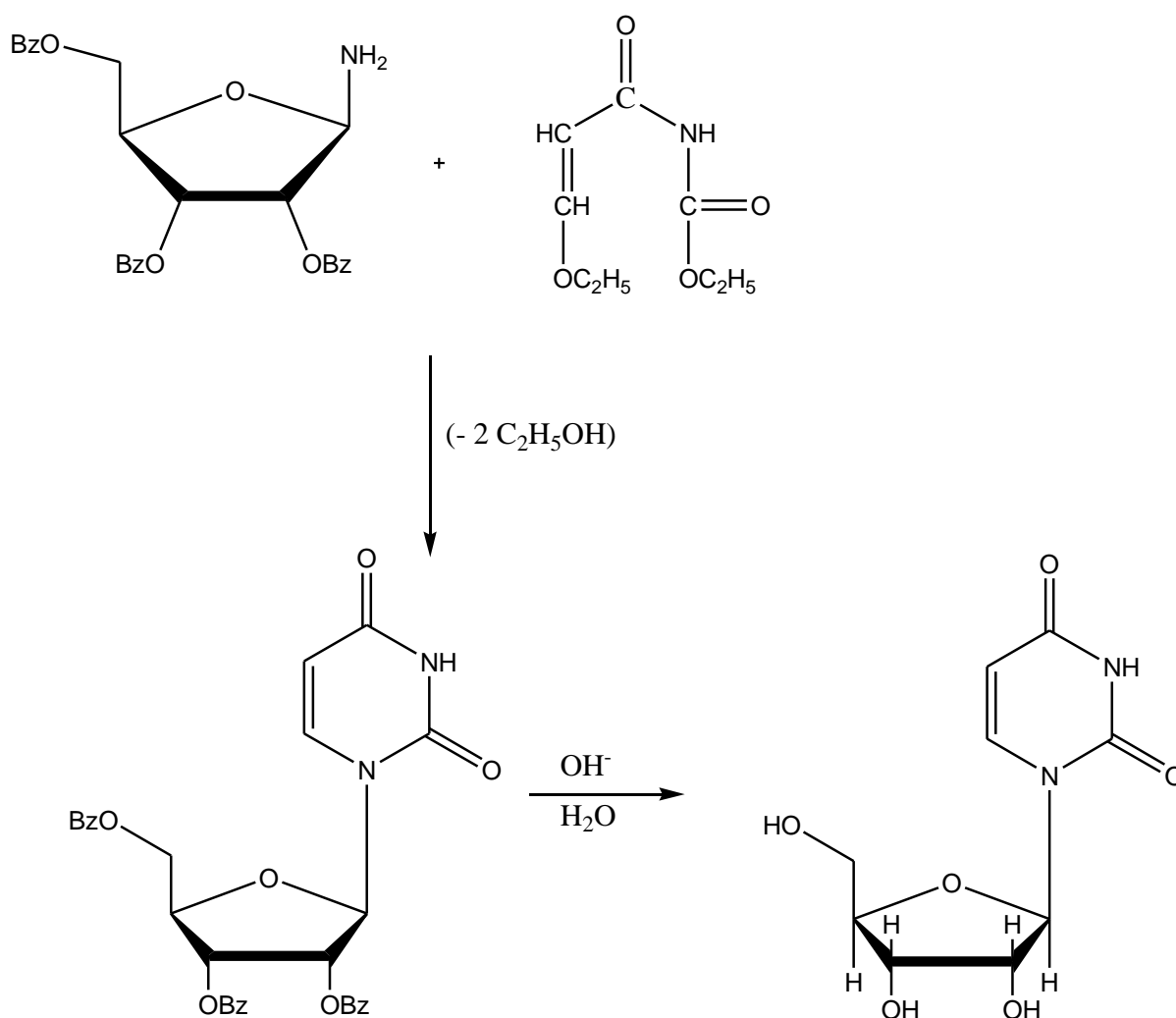
Vorbruggen postupak je poznat kao metoda sinteze nukleozida pomoću Lewisovih kiselinskih katalizatora, najčešće SnCl_4 , trimetilsilil-triflat i trimetilsilil-nonaftalat u kombinaciji s sililiranim bazama. Reagensi za sililiranje su heksametilsilazan (HMDS), trimetilsilil-klorid (TMSCl) te bis(trimetilsilil)acetamid (BSA). U ranijim metodama sinteze koristio se BSA, ali je smjesa HMDS i TMSCl poželjnija jer nusprodukt reakcije (amonijev klorid) ne ometa kasnije reakcije glikozilacije. Ovom metodom nastaju uglavnom β -nukleozidi. Metoda funkcionira tako da se sililirana baza obično generira neposredno prije glikozilacije grijanjem

uz refluks s mješavinom HMDS i TMSCl. Taj postupak je jako dobar za većinu analognih nukleozida s modificiranim bazama koje je teško pripremiti nekim drugim metodama. Veliku prednost i bolja iskorištenja postizala su se korištenjem sililiranih baza. Silili aktiviraju bazu i daju dobro topljive heterocikle, a peracilirani šećeri su stabilniji od halogenoza zato se radije koriste. Postoje još nekoliko odlika sililiranih baza, lako se pripremaju, reagiranjem sa ugljikohidratom daju homogenu otopinu zbog njihove povećane topljivosti i veće nukleofilnosti te omogućuju nastajanje međuprodukata koji se mogu lako pretvoriti u modificiranu bazu. Nakon reakcije silini derivati lagano hidroliziraju, uglavnom za vrijeme obrade produkta. Kontrola stereokemije je također bitna u ovom postupku zbog formiranja međuprodukta acilkosonijevog iona. Stoga, kad ugljikohidratnoj komponenti nedostaje 2-aciloksi supstituent stvaranje glikozidne veze pokazuje smanjenju stereoselektivnost. Pod odgovorajućim uvjetima, termodinamički favorizirani N-9 alikilirani purini i N-1 alkilirani pirimidini mogu se izolirati u dobrom iskorištenju. Trimetilsilil-triflat je slabija Lewisova kiselina od SnCl_4 i omogućava generiranje acil oksonijeva iona ugljikohidrata bez nastajanja kompleksa sa sililiranom bazom. Najčešće korišteni 2-deoksiribonukleozid je 2-deoksi-3,5-di-O-(4-toluoil)ribofuranozil-klorid može se izolirati kao čisti, ali se podvrgava brzom anomerizaciji pri povišenim temperaturama, u polarnim otapalima i uz prisutnost Lewisove kiseline. Međutim, reakcija određenih sililiranih pirimidinskih baza s ugljikohidratim kloridom daje dobar razmjer između brzine i iskorištenja glikozilacije i uz minimalnu anomerizaciju ugljikohidratne komponente koja bi inače dovela do tvorbe nekog drugog nukleozida.



Shema 11. Sililna metoda kondenzacije (Vorbruggen postupak)

Nukleozidi se mogu sintetizirati i građenjem heterocikličke baze (shema 12.). Ova metoda koristi se kod purinskih i pirimidinskih nukleozida. Ima prednost jer je mjesto vezivanja šećera na heterocikličku bazu unaprijed određeno. Na sljedećoj shemi prikazana je sinteza uridina. U toj reakciji reagiraju 2,3,5-tri-*O*-benzoil- β -D-ribofuranozilamin i β -etoksi-*N*-etoksikarbonilakrilamid uz eliminaciju dvije molekule etanola i uklanjanje zaštitnih skupina daju uridin.

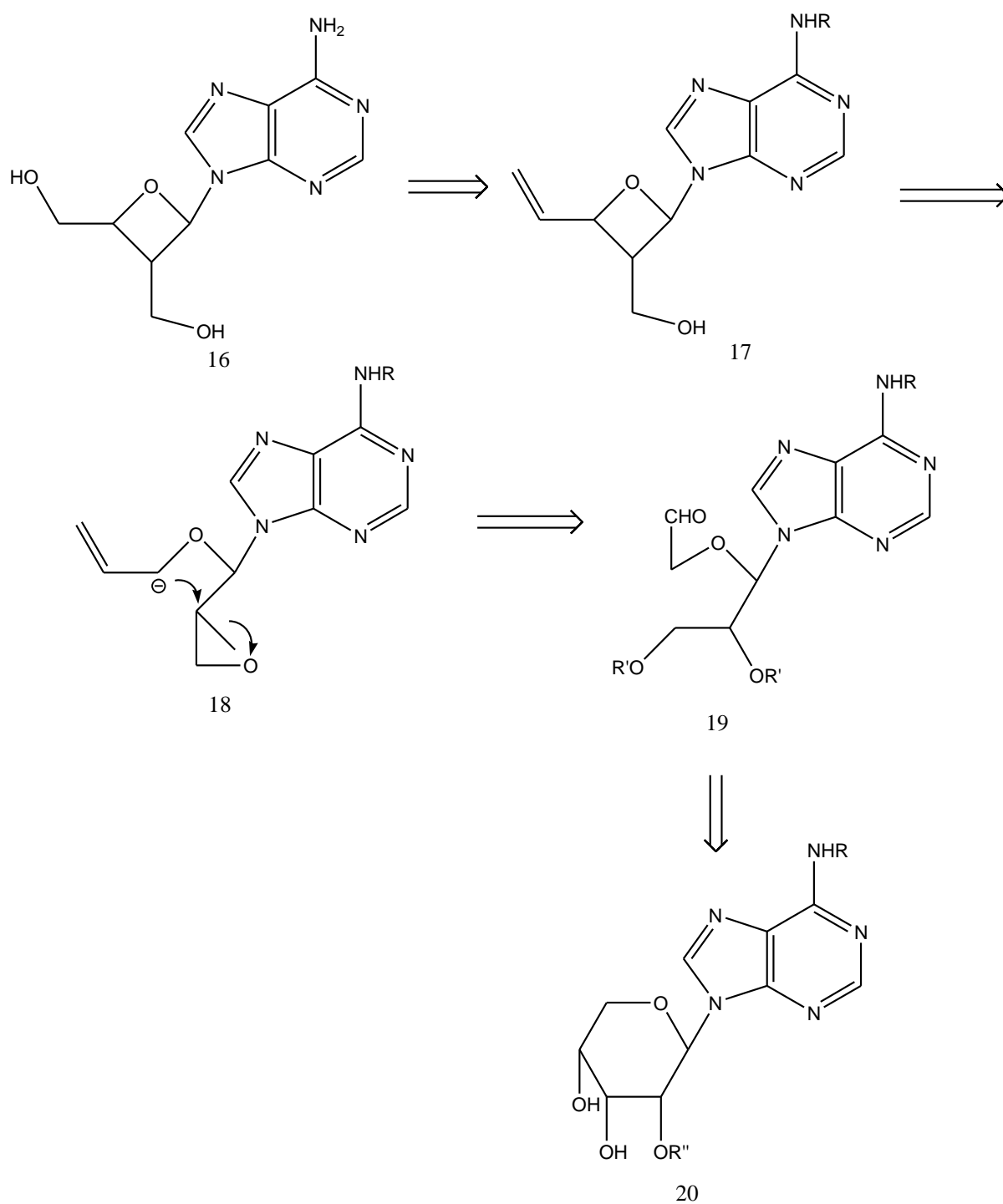


Shema 12. Sinteza uridina građenjem heterocikličke baze

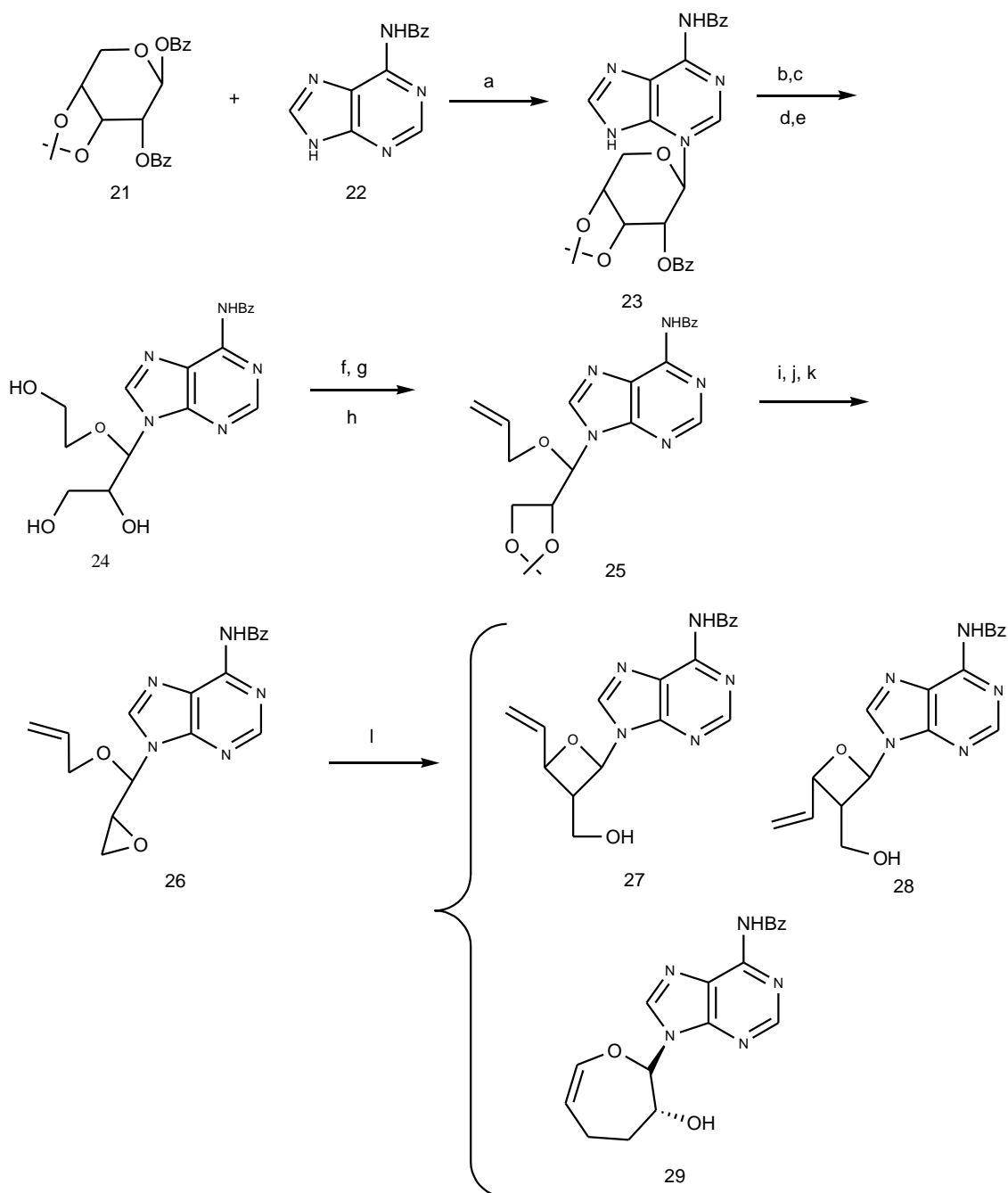
§ 9. Primjena

Nukleozidi i njihovi analozi nalaze svoju primjenu u agrokemiji za proizvodnju herbicida, fungicida i insekticida, u biotehnologiji te u biologiji, a napose u medicini. Najteži zadatak današnje medicine predstavlja borba protiv raka i virusnih bolesti. Kemoterapija se u velikom broju slučajeva pokazala vrlo učinkovitim rješenjem, no njena štetnost za zdravi dio organizma i rezistentnost koju takve bolesti pokazuju dokaz su da je potrebno stalno razvijati nove potencijalne antitumorske i antiviralne agense. Nukleozidni analozi pirimidina i purina predstavljaju značajnu klasu spojeva koji imaju primjenu u antitumorskoj i antivirusnoj terapiji. Antivirusna kemoterapija se sastoji u djelovanju kemoterapeutika na ključne procese reaktiviranja virusa i njihove replikacijske cikluse. Postoje više vrsta modificiranih nukleozidi koji imaju terapeutska djelovanja, to su C-nukleozidi, nukleozidi s modificiranim ugljikohidratom, aciklički nukleozidi, prirodni nukleozidi, karbociklički nukleozidi i nukleozidi s modificiranim bazama.

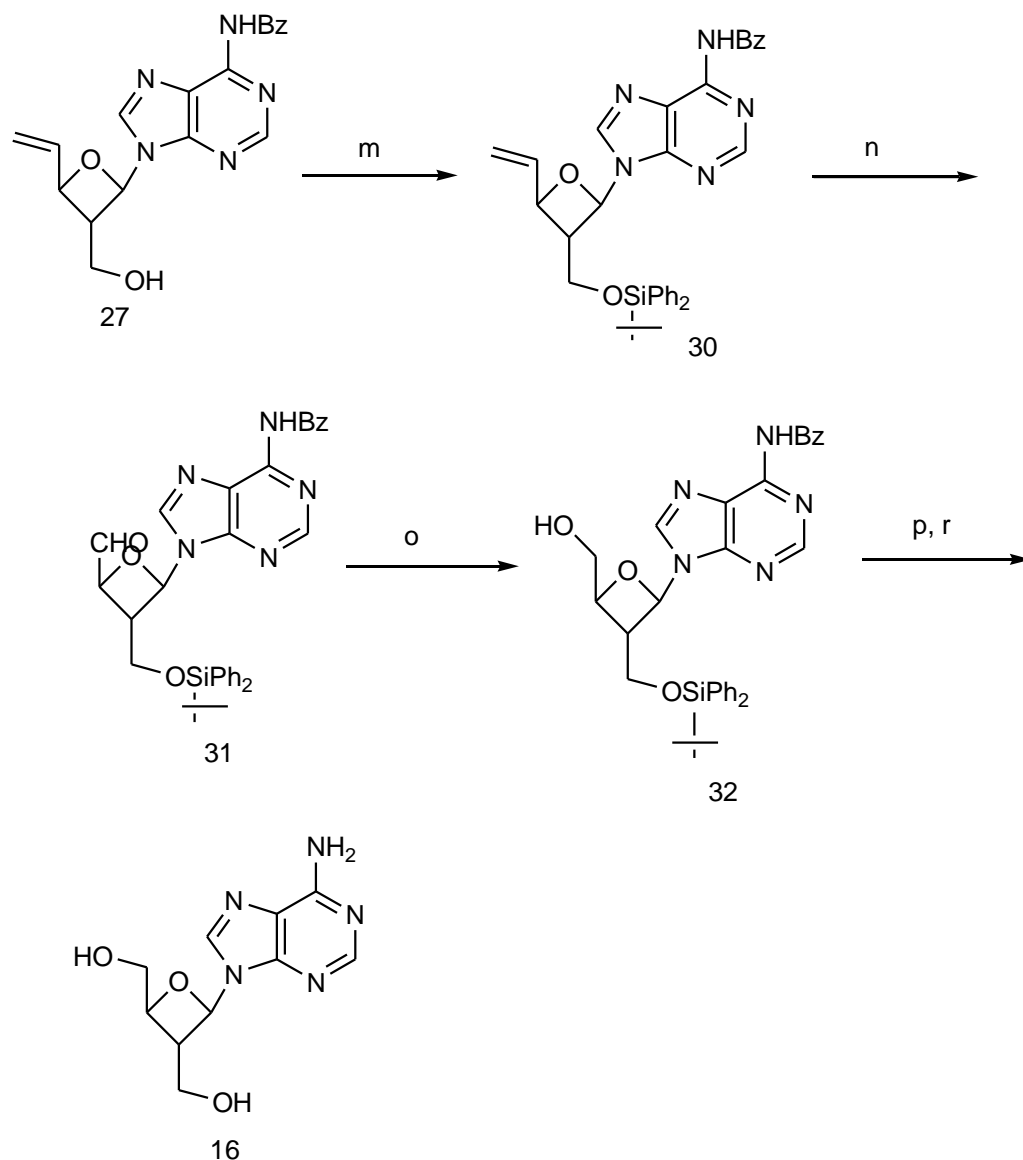
Oksetanocin je analog nukleozida izoliran iz kulture *Bacillus megaterium*. Pokazuje antiviralnu, antitumorsku i antibakterijsku aktivnost. Najizraženije mu je antivirusno djelovanje, inhibira *in vitro* replikaciju virusa humane imunodeficijencije, uzročnika AIDS-a. Njegova struktura određena je rendgenskom kristalografijom. Retrosintetska analiza prikazana je na shemi 13., a sinteza na shemi 14 i 15.

9.1. SINTEZA OKSETANOCINA - nukleozida s modificiranim ugljikohidratom

Shema 13. Retrosintetska analiza oksetanocina prikazana u 4 koraka



Shema 14. Koraci u sintezi oksetanocina. Reagensi i uvjeti za sintezu su sljedeći: a) bis(*p*-nitrofenil)-fosfat, sulfolan, 100 mmHg, 130°, 45min, b) THF-CF₃CO₂H-H₂O (5:4:2), 30°, 21 h, c) NaIO₄, H₂O-MeOH, 25°, 4.5 h, d) NaBH₄, EtOH, -20°, 1 h, e) NaOH-MeOH, 0°, 20 min, f) aceton, 2,2-dimetoksiopropan, TsOH, 25°, 1 h 40 min g) DMSO, Et₃N, CH₂Cl₂, h) Ph₃P=CH₂, HMPA, THF-DMSO, -20°, 30 min, i) THF-CF₃CO₂H-H₂O (5:4:2), 25°, 15.5 h, j) MsCl, Et₃N, DMF-CH₂Cl₂, 0°, 40 min, k) K₂CO₃-MeOH, 25°, 25 min, l) *t*-BuLi, THF, -78°, 20 min.



Schema 15. Nastavak sinteze. Potrebni reagensi i uvjeti su sljedeći: m) *t*-BuSiPh₂Cl, piridin, 16 h, 25°, n) OsO₄, NaIO₄, MeOH-H₂O, 2 h, 25°, o) NaBH₄, 10 min, 0°, p) *n*-Bu₄NF, THF, 30 min, 25° r) NaOMe, MeOH, 15 h, 25°

Sheme 14. i 15. prikazuju strategiju sinteze oksetanocina. Ključno je zaštititi ugljikohidratnu komponentu dvjema zaštitnim skupina, benzoilnom i izopropilidnom, a bazu benzoilno zaštititi na dušiku koji ne sudjeluje u stvaranju glikozidne veze. *N*-glikozidna veza nastaje na način da dođe do nukleofilnog napada zaštićene heterocikličke baze (N-3) na anomerni ugljikov atom zaštićenog ugljikohidrata. Nakon što je glikozidna veza formirana, slijedi modifikacija ugljikohidratne komponente i uklanjanje zaštitnih skupina. Uspjeh ove sinteze

ovisi o ciklizaciji odnosno stvaranju epoksida alilnog etera koji se sintetizira na sljedeći način, a prikazan je na shemi 15. Kondenzacijom 1,2-di-*O*-benzoil-3,4-*O*-izopropiliden- β -D-ribopiranoza (21) s N(6)-benzoiladeninom (22) uz prisutnost katalitičke količine bis (*p*-nitrofenil) fosfata nastaje spoj 23 u iskorištenju od 37 %. Nakon toga se ukloni izopropilidna zaštitna skupina s triflouruoctenom kiselinom nakon čega slijedi oksidacija perjodatom i dobije se dialdehid. Aldehidna grupa se reducira s natrij-bor hidridom. Uklanjanjem benzoilne zaštitne skupine pod bazičnim uvjetima dobije se aciklički triol (24) u 30 %-tnom iskorištenju iz cjelokupnog iskorištenja spoja 23. Vicinalne hidroksilne grupe u spoju 24 zaštićene su acetonidom (85 %), a preostala primarna hidroksilna grupa oksidira se do aldehida (76 %). Wittigovom reakcijom aldehidi daju alilne etere (25) u 33 %-tnom iskorištenju. Nakon hidrolize acetonimida slijedi mezilacija primarnog alkohola i nastaje monomezilat koji je pretvoren u epoksid (26) u 24 %-tnom iskorištenju od cjelokupnog iskorištenja spoja 25. Konačno, ciklizacijom epoksidnog etera u THF dobivaju se vinilni oksetani (27 i 28) i istovremeno nastaje sedmeročlani prsten spoja 29. Spoj 9-(2-oksetanil)-adenin (27) ključni je međuprodukt za sintezu oksetanocina. Slijedi zaštita hidroksilne grupe s *t*-butilkloridfenil silanom u iskorištenju od 77 %. Spoj 30 se oksidira do spoja 31 uz natrijev perjodat i nastaje aldehidna grupa, nakon čega slijedi redukcija s natrij-bor hidridom u spoj 32 u 56 %-tnom iskorištenju. Na kraju se ukloni *t*-butilkloridfenilsililna zaštitna grupa uz prisutnost *n*-Bu₄NF i *N*-benzoilna uz natrijev metoksid i dobije se spoj 16 u 67 %-tnom iskorištenju. Spektralnom analizom u potpunosti je identificiran sintetizirani produkt oksetanocin.

§ 10. Zaključak

Nukleozidi su organski spojevi nastali povezivanjem pirimidinskih ili purinskih baza sa ugljikohidratima *N*-glikozidnom vezom. *N*-glikozidna veza nastaje nukleofilnim napadom dušikova atoma iz heterocikličke baze na elektrofilni anomerni ugljikov atom ugljikohidrata. Prema tome, u glikozidnoj vezi kao glikozil-donori ponašaju se ugljikohidratne komponente, a kao glikozil-akceptori heterocikličke baze. Postoji više metoda za sintezu nukleozida, ali najpovoljnija je sililna metoda. Sililiranje se postiže upotrebom heksametilsilizana (HMDS) koja razvija amonijak kao jedini nusprodukt reakcije. Katalitičkim dodatkom Lewisovih kiselina kao što je trimetilsilil-triflat ubrzava se sililiranje. Acetonitril je najčešće polarno otapalo koje se koristi za reakcije sinteze nukleozida. Budući da heterocikličke baze imaju više mjesta na kojima se može odvijati supstitucija, stereoselektivnost je bitan parametar koji treba kontrolirati prilikom sinteze nukleozida. Kod Hilbert-Johnsonove metode stereoselektivnost se postiže odabirom ugljikohidrata, riboza daje više β -anomera, a deoksiriboza više α -anomera. Također, tijekom uvođenja zaštitnih skupina potrebno je kontrolirati regioselektivnost reakcija i tako omogućiti nastajanje jednog produkta, bez pojave nusprodukta. Virusna i tumorska oboljenja se ubrajaju u vodeće uzroke smrti u suvremenom svijetu, te kao takva predstavljaju velik izazov za medicinu. Uzevši u obzir da je težnja za pronalaskom biološki aktivnih supstanci sve veća, provode se mnoga istraživanja novih bioaktivnih nukleozidnih derivata. Analози nukleozida nastoje se sintetizirati tako da po kemijskoj strukturi budu što sličniji prirodnim nukleozidima kako bi što bolje izvršavali svoju funkciju.

§ 11. Literaturna vrela

1. T. W. G. Solomons, C. B. Fryhle, Organic Chemistry, 8.izdanje, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2003.
2. L.B. Townsend: Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Vol. III, Plenum Press, New York 1994.
3. H. Vorbrüggen, C. Ruh-Pohlenz, Handbook of Nucleoside Synthesis; John Wiley, New York, 2001.
4. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, Nucleic acid in chemistry and biology, 3.izdanje, The Royal Society of Chemistry, 2006.
5. S. Niitsuma, Y. Ichikawa, K. Kato, T. Takita, Tet. Lett. 28 (1987) 3967-3970, 4713-4714
6. http://www.scripps.edu/baran/images/grpmtgpdf/OHara_Jun_12.pdf (10.7.2016.)
7. https://en.wikipedia.org/wiki/Synthesis_of_nucleosides (10.7.2016)